

---

Verfahren zur nichtinvasiven Früherkennung von Dickdarmkrebs  
und/oder Darmkrebsvorläuferzellen

---

5

**Beschreibung**

- 10 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur nichtinvasiven Früherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Dickdarmkrebs-vorläuferzellen, sie betrifft weiterhin Primer, mit denen Mutationsanalysen in ausgewählten Regionen der Gene APC, K-ras,  $\beta$ -Catenin und B-raf in Kombination durchgeführt werden können, sowie 15 einen Kit, der diese Primer umfasst und außerdem die Verwendung der Primer und des Kits zur Mutationsanalyse, insbesondere zur Früherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Dickdarmkrebsvorläuferzellen.
- 20 Im Stand der Technik sind verschiedene Verfahren bekannt, um Dickdarmkrebs zu detektieren. Die gängigsten in der Medizin angewandten Verfahren zur Diagnose von Dickdarmkrebs sind der Haemokulttest, die Sigmoidoskopie und die Kolonoskopie.
- 25 Der Haemokulttest, der auf dem Nachweis von Blut im Stuhl beruht, ist aufgrund vielfältiger möglicher Ursachen von Darmblutungen nicht ausreichend spezifisch für die Diagnose von Dickdarmkrebs. Außerdem ist der Blutverlust aus kleinen kolorektalen Tumoren (< 2 cm) mit 1 bis 2 ml pro Tag so gering, dass er mit diesem Test 30 nicht immer erfasst wird. Die Sigmoidoskopie, eine Spiegelung des Enddarms, kann Tumore des proximalen Kolons nicht erkennen. Geschätzt wird, dass 25 bis 34 % der Kolonkarzinome mit dieser Methode übersehen werden. Die Kolonoskopie, bei der der gesamte Dickdarm gespiegelt wird, erkennt etwa 80 % der Tumore einer Größe 35 von  $\geq 1$  cm, ist jedoch ein invasives Verfahren und aufgrund der daraus resultierenden geringen Akzeptanz bei den Patienten als

regelmäßige Vorsorgeuntersuchung kaum geeignet. Derzeit arbeiten daher mehrere Arbeitsgruppen an der Entwicklung von Verfahren zur Diagnose von Darmkrebs in Stuhlproben.

- 5   Der Nachweis des carcinoembryonalen Antigens (CEA) in Fäces (US Pat. No. 005741650 A) ist kein zuverlässiger Test zur Vorhersage eines beginnenden Dickdarmtumors, sondern er ist vielmehr als Indikator für das Auftreten von Rezidiven geeignet. Ahlquist und Shuber konnten mit der auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) basierenden Methode eine Übereinstimmung von K-ras-Mutationen in 10 Stuhl- und Gewebeproben von Patienten mit Krebs oder großen Adenomen nachweisen. K-ras-Mutationen treten allerdings in weniger als 50 % aller Kolontumore auf und sind auch in nicht neoplastischem Gewebe zu finden, weshalb dieser Marker allein 15 nicht ausreichend für ein Nachweisverfahren zur Früherkennung von Darmkrebs ist. Die gleiche Arbeitsgruppe hat einen Test entwickelt, der 15 definierte Punktmutationen in den Genen für K-ras, APC, p53 sowie Bat-26 detektiert und „long“ DNA in Stuhlproben nachweist. Dieser Test soll derzeit präklinischen 20 Studien unterzogen werden. Aufgrund der großen Anzahl der in diesem Test untersuchten Mutationsstellen sind die zu erwartende Sensitivität und Spezifität sehr hoch, jedoch handelt es sich hierbei auch um einen extrem kostenintensiven Test.
- 25   Bisherige Tests zur Bestimmung von Darmkrebs-auslösenden Mutationen erlauben keinen sicheren Nachweis nur mittels nicht-invasiv gewonnener Proben, insbesondere Stuhlproben. Im Stand der Technik sind Primersequenzen offenbart, die einzelnen Mutationsnachweisen dienen. Sofern diese in Kombination im Stuhl eingesetzt werden, ist aufgrund von unerwünschten Interaktionen 30 mit dem Stuhl und untereinander kein sicherer Nachweis von mehreren Mutationen möglich. Vor allem die zahlreichen Bestandteile der Darmflora „maskieren“ die Primer so, dass diese nicht mehr an ihr Target binden. Bekannte Verfahren verwenden daher bei einer Kombination von Primern isolierte Zellen aus dem Stuhl und nicht diesen direkt. Da Stuhlproben weiterhin Wildtyp- 35 und mutierte DNA umfassen, ist eine direkte Sequenzierung von PCR-Produkten nicht möglich.

Im Stand der Technik ist auch ein Testsystem zum Nachweis von Krebserkrankungen beschrieben, bei dem die Detektion eines antiapoptotischen Mitglieds der Bcl-2 Familie in Kombination mit 5 einem Mitglied der Raf Familie verwendet wird. Hierbei müssen jedoch beide Marker in der gleichen Probe vorhanden sein. Proben sind hierbei transgene nicht menschliche Säugetiere oder isolierte menschliche oder nicht-menschliche Zellen. Eine Anwendung dieser Testsysteme bei dem Probenmaterial humaner Stuhl 10 ist nicht möglich.

Weiterhin ist im Stand der Technik die Verbindung von B-raf Genen und ihre Verwendung zum Nachweis von Tumoren offenbart. Hierbei werden die Mutanten aus einem humanen Primärtumor isoliert, der 15 durch einen invasiven Eingriff entnommen werden muss. Aus diesem wird dann ein Polypeptid isoliert. Gesundes Kontrollgewebe des Patienten muss ebenfalls entnommen werden. Mit diesem Verfahren können frühe Mutationen nicht nachgewiesen werden. Auch mit diesem Verfahren ist eine Untersuchung von Stuhlproben nicht möglich, 20 sondern nur an detektierten und isolierten vollständigen Tumorzellen, aus denen bevorzugt Polypeptide isoliert werden. Weiterhin beschränkt sich dieses Verfahren auf definierte Punktmutationen, so dass innerhalb eines eingegrenzten Sequenzbereiches Mutationen wie Insertionen, Deletionen oder 25 andere nicht erfasst werden können. Mögliche Kombinationen mit anderen Genen werden nicht offenbart oder nahegelegt.

Weiterhin sind Verfahren bekannt, mit denen zirkulierende Krebszellen in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können. 30 Alle diese Verfahren sind ohne Isolierung und Detektion von vollständigen Tumorzellen nicht als Diagnoseverfahren einsetzbar.

Beschrieben sind auch Screeningverfahren für Therapeutika, die den β-Catenin-Signalweg modifizieren. Hierzu werden Sonden benutzt, 35 die sogenannten Cadherin-„Perturbagen“. Die offebarten Sequenzen hybridisieren mit Cadherin, einem β-Catenin-bindenden Protein, nicht jedoch mit β-Catenin selbst.

Im Stand der Technik sind weiterhin Verfahren bekannt, bei denen die DNA-Integrität und die DNA-Menge für ausgewählte Gene, wie z. B. K-ras und APC bestimmt und in Relation zu Standards bzw. Schwellenwerten gesetzt werden. Derartige Verfahren offenbaren jedoch keine Mutationsanalyse und es werden auch keine Primersequenzen offenbart, die besonders vorteilhaft sind. Diesen Verfahren ist gemeinsam, dass keine Mutationsanalyse, beispielsweise mit einem automatisierbaren, elektrophoretischen Verfahren, wie z. B. SSCP, durchgeführt wird.

10

Weiterhin sind Verfahren bekannt, bei denen mit Azoxymethan behandelten Ratten mittels Lasermikrodissektion Gewebe aus intramukosalen Läsionen oder Kolon-Tumoren isoliert werden. Aus diesen Läsionen und Tumoren wird DNA isoliert, Teile des Exons 3 des β-Catenin-Gens und des Exons 1 des K-ras-Gens amplifiziert und mittels einer Mutationsanalyse direkt sequenziert. Derartige Verfahren können jedoch nicht bei Stuhlproben angewendet werden, da Stuhlproben ein Gemisch aus Wildtyp- und mutierter DNA enthalten. Somit ist eine direkte Sequenzierung der PCR-Produkte bei diesem Verfahren nicht möglich.

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Dickdarmkrebs bzw. Dickdarmkrebsvorläuferzellen einfach, sicher und effektiv in einer Stuhlprobe detektiert werden können, wobei die Nachteile des Standes der Technik vermieden werden, insbesondere die nicht erwünschte Interaktion der Primer untereinander und mit der Stuhlprobe.

Die Erfindung löst dieses Problem durch die Bereitstellung eines Verfahrens zur nichtinvasiven Früherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Darmkrebsvorläuferzellen durch Mutationsanalyse der Gene für APC, K-ras, β-Catenin und B-raf in einer Probe, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:

- Entnahme einer Stuhl- und/oder Gewebeprobe,
- Homogenisieren der Probe,
- Gewinnung von DNA aus der Probe,

- Durchführung einer Amplifizierungsreaktion, bevorzugt einer PCR-Reaktion, in den Genen für APC, K-ras, β-Catenin und B-raf,

wobei für APC die Primer  
5        s1     TTGCAGTTATGGTCAATAACCC  
          as1    GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG  
          s2     CCTCAAAAGGCTGCCACTTG  
          as2    CTGTGACACTGCTGGAACCTTCGC  
          s3     AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG  
10       as3    TGGCATGGTTGTCCAGGGC  
          s4     ACAAACCATGCCACCAAGCAGA  
          as4    GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG  
          s5     TTCCAGATGCTGATACTTTA  
          as5    CTGAATCATCTAATAGGTCC,  
15       für K-ras die Primer  
          s     CTGGTGGAGTATTGATAGTG  
          as    TCTATTGTTGGATCATATTG  
und für β-Catenin die Primer  
          s     CTGATTTGATGGAGTTGGAC  
20       as    CTTGAGTGAAGGACTGAGAA  
und/oder für B-raf die Primer  
          s     TGTATCACCATCTCCATATC  
          as    GCATTCTGATGACTTCTGGT

25       verwendet werden, wobei Amplifikationsprodukte entstehen und  
- Durchführung einer Mutationsanalyse in den Amplifikations-  
produkten.

Alternativ können in dem Verfahren oder in einem Kit als  
30       Primerpaar für humanes APC s2/as2 auch eingesetzt werden:  
s2:       GAATCAGCTCCATCCAAGT  
as2:       TTTCTGCTATTGCAGGGT.

Überraschenderweise ist es mit diesem Kombinationsverfahren  
35       möglich, nichtinvasiv, billig und einfach und mit einer Ersparnis  
an Zeit, Material und Arbeitsstufen sowie mit einer Ersparnis an  
Kosten, schwer zu beschaffender Feinchemikalien sowie mit einer  
erhöhten Zuverlässigkeit und größeren Effektivität Dickdarmkrebs

und/oder Dickdarmkrebsvorläuferzellen sehr früh zu erkennen. Die erfindungsgemäße Kombination der Verfahrensschritte vermehrt weiterhin die technischen Möglichkeiten der Krebsdiagnostik und stellt somit eine weitere Möglichkeit zur Früherkennung von  
5 Dickdarmkrebs zur Verfügung.

Die geringe Anzahl an Arbeitsstufen ermöglicht es vorteilhafterweise, das Verfahren gegebenenfalls zu automatisieren oder zu miniaturisieren.  
10

Das erfindungsgemäße Verfahren vereint weiterhin die Vorteile der einfachen Probengewinnung und die Möglichkeit, entstehenden Dickdarmkrebs bzw. Dickdarmkrebsvorläuferzellen in einem frühen Stadium zu diagnostizieren. Da es sich um ein nichtinvasives  
15 Verfahren handelt, bei dem beispielsweise die Abgabe einer Stuhlprobe oder gegebenenfalls einer Gewebeprobe ausreichend ist, erreicht das Verfahren eine hohe Akzeptanz bei den Probanden, bei denen es sich beispielweise um Menschen oder Tiere handeln kann. Daher kann das Verfahren für Routinetests, aber auch für  
20 Vorsorgeuntersuchungen Anwendung finden. Aufgrund der verwendeten Kombination der drei untersuchten Gene, APC, K-ras und  $\beta$ -Catenin und/oder B-raf, die so mit frühen Mutationsergebnissen während der Kolonkanzerogenese in Verbindung gebracht werden, kann eine höhere Sensitivität und Spezifität erreicht werden als bei den bekannten  
25 Tests, die sich insbesondere nur auf die Mutation eines Gens beschränken. Vorteilhafterweise ist das erfindungsgemäße Verfahren nicht auf einige wenige definierte Punktmutationen festgelegt, sondern mit dem Verfahren ist es möglich, innerhalb der Bereiche, in den bei den untersuchten Genen gehäuft Mutationen auftreten,  
30 gegebenenfalls auch bisher unbekannte Mutationen zu erfassen.

Da unterschiedliche Arten von Dickdarmkrebs unterschiedliche Wege bei der Kanzerogenese beschreiten, bestand eine Schwierigkeit für die Entwicklung eines diagnostischen Kits darin, geeignete Marker  
35 zu kombinieren, die möglichst umfassend alle Arten bzw. viele Arten von Kolonkarzinomen erfassen, wie beispielsweise auch spontane Kolonkarzinome mit und ohne Mikrosatelliten-Instabilität, die durch unterschiedlichste Stimuli ausgelöst werden können, wie

zum Beispiel Ernährung, häufiger Alkohol- oder Tabakkonsum, Expositionen gegenüber physikalischen oder chemischen Einflüssen usw.

5 Die gewählte Kombination der vier genannten Gene in Kombination mit den beanspruchten Primern ermöglicht eine einfache, sichere und effektive Diagnose von Dickdarmkrebs.

Überraschend konnte also gezeigt werden, dass durch die  
10 Kombination des Nachweises mittels definiert ausgewählter Primer eine nicht-invasive Frühherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Dickdarmkrebsvorläuferzellen möglich ist. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, bei dem fünf Verfahrensschritte zusammenwirken, werden Amplifizierungsreaktionen in vier Genen mit  
15 ausgewählten Markern durchgeführt. Die einzelnen Amplifizierungsreaktionen wie auch die einzelnen fünf Schritte des Verfahrens wirken zur Erreichung des technischen Gesamterfolges der nicht-invasiven Frühherkennung von Dickdarmkrebs und/oder von Dickdarmkrebsvorläuferzellen in der untersuchten Probe zusammen.

20 Durch die funktionelle Abhängigkeit der einzelnen Verfahrensschritte und der Amplifizierungsreaktionen ist der technische Gesamterfolg der Krebsfrühherkennung möglich. Hierbei ist es im Sinne einer Kombinationserfindung nicht erforderlich, dass die einzelnen Verfahrensschritte sich in gegenseitiger  
25 Abhängigkeit befinden oder dass diese gleichzeitig getätigt werden. Denn die einzelnen Verfahrensschritte, insbesondere die einzelnen Amplifizierungsreaktionen bringen kein isoliertes Einzelergebnis hervor, sondern die einzelnen Verfahrensschritte werden durch den Kombinationsgedanken der anmeldungsgemäßen Lehre  
30 zu dem einheitlichen Ziel der sicheren nicht-invasiven Frühherkennung in einer Stuhlprobe zusammengefasst. Eine solche sichere technische Aussage wäre durch die einzelnen nicht-kombinierten Verfahrensschritte nicht möglich. Die Einzelbestimmung der einzelnen Mutationsanalysen lässt keine  
35 sichere Aussage in einer Stuhlprobe darüber zu, ob sich in dieser Dickdarmkrebs- oder Dickdarmkrebsvorläuferzellen im Frühstadium befinden. Die Ergebnisse der einzelnen Verfahrensschritte und insbesondere der einzelnen Amplifizierungsreaktionen können

beispielsweise mit Hilfe eines Algorithmus ausgewertet und kombiniert werden, so dass Aussagen zur nicht-invasiven Früherkennung möglich sind. Nur durch diese Kombination ist es möglich, eine sichere und schnelle Aussage zu Dickdarmkrebs 5 und/oder Dickdarmkrebsvorläuferzellen in einer Probe, insbesondere in einer Stuhlprobe zu treffen.

Die Tumormarker sind in dem Verfahren so kombiniert, dass jede Patientenprobe mit insgesamt vier Markern analysiert wird, nämlich 10 mit jeweils zwei bei einer Krebserkrankung alternativ mutierten Markern aus mindestens zwei verschiedenen - mit Zellproliferation bzw. Tumorwachstum assoziierten - biochemischen Signalwegen. Marker sind hierbei die untersuchten Gene. Aus einem Markergen können so gegebenenfalls mehrere Abschnitte analysiert werden. Die 15 Signalwege, die mit den in dem Verfahren integrierten Markern abgedeckt werden, sind der wnt-Signalweg und der MAPK-Signalweg. Bestandteile des Verfahrens sind aus dem wnt-Signalweg die Marker APC einerseits und  $\beta$ -Catenin andererseits, gemeinsam mit den Markern k-ras einerseits und B-raf andererseits aus dem MAPK- 20 Signalweg. Mit der Kombination der beiden Marker aus dem wnt-Signalweg zusammen mit den beiden Markern aus dem MAPK-Signalweg können Kolonkarzinome sicher diagnostiziert werden. Mit dieser Kombination kann sogar eine der Koloskopie vergleichbare 25 Sensitivität in der nichtinvasiven Kolonkarzinomdiagnostik erzielt werden. Darüber hinaus sind dies vorteilhafterweise Marker, die zu einem frühen Zeitpunkt während der Kolonkanzerogenese mutieren.

Mit Vorteil werden durch die erfindungsgemäße Lehre Mutationen in Genen, die zwei Signalwege betreffen, detektiert: Damit jede Zelle 30 des menschlichen Körpers auf äußere Signale bzw. auf Signale von anderen Zellen reagieren kann, müssen diese Signale erkannt, verarbeitet und weitergeleitet werden. Dies geschieht über intrazelluläre Signalwege. Ein Signalweg beginnt mit dem Eintreffen des Signals, beispielsweise eines Hormons oder eines 35 Neurotransmitters an der Zelloberfläche. Das Signalmolekül bindet an zelleigene Proteine, die Rezeptoren, die dadurch aktiviert werden und im Zellinneren eine Kaskade in Gang setzen, in deren Verlauf weitere Proteine aktiviert werden. Dabei wird das

auslösende Signal zugleich verstärkt. Am Ende der Kaskade bzw. des Signalwegs stehen entweder Enzyme, die eine wichtige Funktion im Stoffwechsel haben oder Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression regulieren. Diese Signalwege regulieren zum Beispiel den Stoffwechsel, das Wachstum und die Zellteilung. Es ist das Verdienst der Erfinder, erkannt zu haben, dass durch die Analyse des wnt-Signalweges, der die Zelladhäsion und Zellwanderung reguliert, und des MAPK-Signalweges, der die Zellteilung und Zellentwicklung steuert, die Tumorwahrscheinlichkeit nichtinvasiv sicher bestimmt werden kann. Durch Mutationen in den beteiligten Genen kommt es zu Fehlregulationen dieser intrazellulären Signalwege, beispielsweise zu einem vollständigen Funktionsverlust einer Komponente eines Signalweges oder auch zu einer permanenten Aktivierung und somit zur Tumorentstehung.

Es ist bekannt, daß beim kolorektalen Karzinom häufig das APC-Gen mutiert vorliegt. Das Genprodukt ist dann ein verkürztes Protein, daß die Menge des in der Zelle vorhandenen β-Catenin-Proteins nicht mehr regulieren kann. β-Catenin setzt daraufhin im Komplex mit dem Transkriptionsfaktor TCF die Genexpression von Zielgenen mit der Konsequenz einer unkontrollierten Zellproliferation in Gang. Alternativ kann das β-Catenin-Gen durch Mutation konstitutiv aktiviert sein. Jedoch ist in Tumorzellen immer nur entweder APC oder β-Catenin mutiert, nicht beide gleichzeitig. Das ist sinnvoll, da diese beiden alternativen Mutationen den gleichen Effekt haben, weil die betreffenden Genprodukte im gleichen intrazellulären Signalweg, dem wnt-Signalweg vorkommen.

Vergleichbar ist die Situation beim MAPK-Signalweg. Die Komponenten k-ras und B-raf sind beim kolorektalen Karzinom ebenfalls alternativ mutiert und dadurch konstitutiv aktiviert.

Auch hier ist die Folge die unkontrollierte Zellteilung und somit die Tumorentstehung.

Mit der Kombination der alternativ mutierten Marker APC, β-Catenin, k-ras und B-raf werden zwei Signalwege, die zur Tumorentstehung beitragen, diagnostisch abgedeckt und mit dieser Markerkombination können Tumore mit einer sehr hohen Sensitivität und zu einem sehr frühen Zeitpunkt nichtinvasiv nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Kombination der beiden Signalwege bzw. der sich gegenseitig ausschließenden Genmutationen aus den beiden genannten Signalwegen in einem Test ist es mit Vorteil möglich, dass die 5 meisten Tumore sicher erfasst werden können, da während ihrer Entstehung mindestens einer der beiden o. g. Signalwege betroffen ist mit der Folge einer gestörten Zell-Zell-Adhäsion oder einer vermehrten Transkription von Genen, die das Zellwachstum oder die Zellteilung in Gang setzen. Diese Zusammensetzung der Palette an 10 Tumormarkern, die in dem erfindungsgemäßen Testverfahren verwendet wird, und die für die Tumorentstehung wichtigen Signalwege in der Zelle durch jeweils zwei sich gegenseitig ausschließende Mutationen als Marker berücksichtigt, unterscheidet sich von anderen bisherigen Tests, die einfach möglichst viele Marker, die 15 beim kolorektalen Karzinom häufig mutieren, in einen Test integrieren.

Selbstverständlich ist es möglich, weitere Paare von Genmutationen, die sich gegenseitig ausschließen bzw. die in 20 kolorektalen Karzinomen alternativ auftreten und die in weiteren gemeinsamen Signalwegen vorkommen, als Marker in das Verfahren oder einen Test, mit dem dies durchgeführt werden kann, zu integrieren.  
25 Mit Vorteil können auch bisher unbekannte Mutationen in den gewählten Sequenzabschnitten detektiert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann beispielsweise so erfolgen, dass aus humanem Stuhl eine erbsengroße Portion des abgesetzten 30 Stuhls entnommen und folgend in flüssigem Stickstoff schockgefroren wird. Weiterhin ist es selbstverständlich auch möglich, dass humanes Tumorgewebe oder deren Vorläufer wie beispielsweise aberrante Crypten, Adenome bzw. Adenokarzinome, die in der Biopsie z. B. im Verlauf der Koloskopie oder bei einer OP 35 entnommen wurden, verwendet werden. Anschließend kann die Stuhlprobe bzw. die Gewebeprobe homogenisiert werden, wobei dies beispielsweise in Puffersystemen mit den dem Fachmann bekannten Kits erfolgen kann. Anschließend werden die so homogenisierten

Proben zentrifugiert, so dass aus dem Überstand des Probenhomogenats DNA isoliert werden kann. Gegebenenfalls ist es möglich, vor diesem Schritt der Isolierung der DNA eine Anreicherung derselben vorzunehmen. Dies kann beispielsweise so 5 erfolgen, dass die Zielgene aus der Gesamt-DNA durch Hybridisierung sequenzspezifischer biotinylierter Oligonukleotide mit den Zielgenen APC, K-ras,  $\beta$ -Catenin und B-raf und der Kopplung des Biotinrestes an Streptavidin und weiterhin der Separation über magnetische Partikel mittels dem Fachmann bekannter Kits gewonnen 10 werden. Hierbei sind die Oligonukleotidsequenzen so zu wählen, dass sie mit Bereichen hybridisieren, die von den nachfolgend verwendeten Primern begrenzt werden oder dicht neben dem amplifizierten Abschnitt liegen.

15 Weiterhin ist es bevorzugt möglich, eine Anreicherung vorzunehmen durch den Ausschluss von fragmentierter DNA mit einer Größe von < 200 bp, die charakteristisch für DNA aus apoptotischen Zellen ist. Hierdurch wird neoplastische „long“-DNA separiert. Anschließend kann beispielsweise eine andere 20 Amplifikationsreaktion mit sequenzspezifischen Primern gegen ausgewählte Bereiche in den Genen APC, K-ras,  $\beta$ -Catenin und B-raf durchgeführt werden. Hierbei sind für APC die Primerpaare so gewählt, dass sie eine Amplifizierung überlappender Frequenzen in Exon 15 innerhalb des bekannten Bereichs gehäuft auftretender 25 Mutationen (mutational cluster region; MCR) ermöglichen. Für  $\beta$ -Catenin sind die Primer beiderseits der in Exon 3 lokalisierten MCR positioniert und für K-ras sind die Primer beiderseits der bekannten in Exon 1 lokalisierten, MCR positioniert. Alle Primer werden so gewählt, dass sie PCR-Produkte einer Größe von 180 bis 30 350 bp haben. Eingesetzt werden hierbei die folgenden Primersequenzen; jeweils in 5'→3'-Richtung:

**K-ras**

s CTGGTGGAGTATTTGATAGTG  
35 as TCTATTGTTGGATCATATTG

 **$\beta$ -Catenin**

s CTGATTGATGGAGTTGGAC

as CTTGAGTGAAGGACTGAGAA

**APC**

s1 TTGCAGTTATGGTCAATAACCC  
5 as1 GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG  
s2 CCTCAAAAGGCTGCCACTTG  
as2 CTGTGACACTGCTGGAACCTCGC  
s3 AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG  
as3 TGGCATGGTTGTCCAGGGC  
10 s4 ACAAACCATGCCACCAAGCAGA  
as4 GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG  
s5 TTCCAGATGCTGATACTTTA  
as5 CTGAATCATCTAATAGGTCC  
oder alternativ:  
15 s2 GAATCAGCTCCATCCAAGT  
as2 TTTCTGCTATTGCAGGGT

**B-raf**

s TGTATCACCCTCTCCATATC  
20 as GCATTCTGATGACTTCTGGT

Im weiteren Verfahrensverlauf ist es bevorzugt möglich, dass die mit den Primern gewonnenen PCR-Produkte mittels eines Agarosegels untersucht werden. Die Reinigung der PCR-Produkte kann aber auch 25 ohne die Kontrolle der PCR-Produkte in einem Agarosegel mit einem dem Fachmann bekannten Kit vorgenommen werden. Für die Mutationsanalyse der PCR-Produkte stehen dem Fachmann mehrere bekannte Verfahren zur Verfügung, wie beispielsweise die Elektrophoresetechnik, bevorzugt Single-Stranded-Conformation 30 Polymorphism Analysis (SSCP).

Mit Hilfe der SSCP-Analyse ist es bevorzugt möglich, Polymorphismen und Mutationen in DNA-Einzelsträngen schnell und einfach nachzuweisen. Dabei macht man sich zu Nutze, dass die 35 Einzelstränge unter nicht-denaturierenden Gelbedingungen nicht linear, sondern durch intramolekulare Basenpaarungen im gefalteten Zustand vorliegen. Bereits ein Basenaustausch pro Strang reicht dabei für ein unterschiedliches Laufverhalten aus. Die Spezifität

soll bei Fragmenten mit einer Länge vom 200 bp annähernd 100 % betragen. Laufzeit, Leistung, Vernetzung und Acrylamidkonzentration können für verschiedene DNA-Abschnitte jeweils einzeln durch Routineversuche optimiert werden. Um die 5 Auftrennung der Einzelstränge zu verbessern, kann Glycerin beigemischt werden.

Hierbei kann eine Detektion der Konformation der Einzelstränge der Proben im Vergleich zum Wildtypstandard vorgenommen werden. 10 Gegebenenfalls kann es sinnvoll sein, eine DNA-Extraktion aus dem SSCP-Gel und eine Sequenzierung aus der so extrahierten DNA oder der korrespondierenden PCR-Produkte vorzunehmen, um bestimmte Mutationen spezifisch zu detektieren. Weitere Methoden der Mutationsanalyse sind DHPLC und die DNA-Chip-Technologie.

15 Der so vorgenommene Nachweis von Mutationen, bei denen als Marker die Gene APC, K-ras,  $\beta$ -Catenin und B-raf eingesetzt werden, ist vorteilhaft, weil auf diese Weise alle Typen von spontanen Kolonkarzinomen zu einem besonders frühen Zeitpunkt erfasst werden 20 können, da in den Tumorvorstufen, den aberranten Crypten und Adenomen, zu einem hohen Prozentsatz K-ras oder  $\beta$ -Catenin mutiert vorliegt, sowie in den Adenomen und frühen Adenokarzinomen entweder APC oder  $\beta$ -Catenin mutiert ist.

25 Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich daher nicht nur einige genau bekannte Mutationen erfassen, sondern es werden innerhalb derjenigen Genabschnitte, für die bekannt ist, dass dort besonders häufig Mutationen auftreten, alle gegebenenfalls auch unbekannte Punktmutationen detektiert. Dieses Verfahren ist 30 beispielsweise den immunologischen Nachweisen eines aufgrund einer Mutation trümmerten Proteins überlegen. Vor allem durch die Paarung K-ras/B-raf innerhalb der erfindungsgemäßen Kombination ist eine besonders sichere Diagnose möglich, da mit diesen Markern der MAPK-Signalweg diagnostisch abgedeckt wird.

35 Selbstverständlich ist es insbesondere möglich, dass die Detektion von Mutationen in ausgewählten Abschnitten der Gene für APC, K-ras,  $\beta$ -Catenin und B-raf mittels eines DNA-Chips erfolgt, wobei

der DNA-Chip Sonden für APC, K-ras,  $\beta$ -Catenin und B-ras aus denjenigen Bereichen der genannten Gene enthält, die durch die genannten Primersequenzen flankiert werden. Mit durch die Primersequenzen begrenzen oder flankieren ist gemeint, dass bei 5 der DNA-Chip-Technologie nicht notwendigerweise die konventionellen PCR-Primer eingesetzt werden, die einen DNA-Strang von der Länge amplifizieren, die durch die Lage der beiden Primer (sense und antisense) bestimmt wird. In dem Fall der konventionellen PCR begrenzen oder flankieren die Primer das PCR- 10 Produkt. Im Gegensatz dazu werden bei DNA-Chips oft einzelne Oligonukleotide als Sonden verwendet, die mit der Proben-DNA hybridisieren. Die Sonde kann dann z. B. eine definierte Punktmutation enthalten. Einerseits können die genannten Primer 15 als Sonden im Chip enthalten sein, aber auch weitere Sonden, die mit anderen Abschnitten der Produkte aus den PCR-Reaktionen mit den genannten Primern hybridisieren.

Die Erfindung betrifft auch Primersequenzen ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

20

die Primer

SEQ ID-Nr. 1	TTGCAGTTATGGTCAATAACCC,
SEQ ID-Nr. 2	GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG,
SEQ ID-Nr. 3	CCTCAAAAGGCTGCCACTTG,
SEQ ID-Nr. 4	CTGTGACACTGCTGGAACCTCGC,
SEQ ID-Nr. 5	AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG,
SEQ ID-Nr. 6	TGGCATGGTTGTCCAGGGC,
SEQ ID-Nr. 7	ACAAACCATGCCACCAAGCAGA,
SEQ ID-Nr. 8	GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG,
SEQ ID-Nr. 9	TTCCAGATGCTGATACTTTA,
SEQ ID-Nr. 10	CTGAATCATCTAATAGGTCC,
SEQ ID-Nr. 11	CTGGTGGAGTATTGATAGTG,
SEQ ID-Nr. 12	TCTATTGTTGGATCATATTG,
SEQ ID-Nr. 13	CTGATTGATGGAGTTGGAC,
SEQ ID-Nr. 14	CTTGAGTGAAGGACTGAGAA,
SEQ ID-Nr. 15	GAATCAGCTCCATCCAAGT,
SEQ ID-Nr. 16	TTTCTGCTATTGCAGGGT,
SEQ ID-Nr. 17	TGTATCACCATCTCCATATC,

SEQ ID-Nr. 18                    GCATTCTGATGACTTCTGGT,

wobei die Sequenzen  
s       CTGGTGGAGTATTTGATAGTG,  
5 as      TCTATTGTTGGATCATATTG,  
für K-ras verwendet werden,  
die Sequenzen  
s       CTGATTGATGGAGTTGGAC,  
as      CTTGAGTGAAGGACTGAGAA,  
10 für β-Catenin verwendet werden und die Sequenzen  
s1     TTGCAGTTATGGTCAATAACCC,  
as1    GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG,  
s2     CCTCAAAAGGCTGCCACTTG,  
as2    CTGTGACACTGCTGGAACCTCGC,  
15 s3     AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG,  
as3    TGGCATGGTTGTCCAGGGC,  
s4     ACAAAACCATGCCACCAAGCAGA,  
as4    GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG,  
s5     TTCCAGATGCTGATACTTTA,  
20 as5   CTGAATCATCTAATAGGTCC,  
oder alternativ  
s2     GAATCAGCTCCATCCAAGT  
as2    TTTCTGCTATTGCAGGGT  
für APC verwendet werden  
25 und die Sequenzen  
s      TGTATCACCATCTCCATATC  
as      GCATTCTGATGACTTCTGGT  
für B-raf verwendet werden.  
30 Die Primer können mit Vorteil zur Diagnose von Dickdarmkrebs  
und/oder Dickdarmkrebsvorläuferzellen eingesetzt werden.

In dem Verfahren werden Primersequenzen verwendet, die zu den  
nachfolgend angegebenen Bereichen auf den Genen für APC,  
35 β-Catenin, k-ras und B-raf ausreichend homolog sind, um durch die  
Polymerasekettenreaktion ein Amplifizierungsprodukt zu bilden:

Bezeichnung des Gens	GenBank (NIH, USA) Accession no	Primerposition
APC	NM 000038	s1: 3020-3040 as1: 3283-3259
		s2: 3765-3784 as2: 4022-4000
		s3: 4021-4045 as3: 4334-4315
		s4: 4322-4343 as4: 4563-4540
		s5: 4483-4502 as5: 4740-4721
(alternativ)		s2: 3722-3740 as2: 3957-3939
β-Catenin	NM 001904	s: 228-247 as: 443-424
k-ras	L 00045	s: 4-24 as: 205-185
B-raf	M 95712	fw: 1671-1690 rev: 1924-1943

Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der die Primer umfasst, sowie die Verwendung des Kits zur nichtinvasiven Früherkennung von 5 Dickdarmkrebs und/oder Darmkrebsvorläuferzellen. Der Kit kann gegebenenfalls Informationen zum Kombinieren der Inhalte des Kits umfassen. Der Kit kann auch weitere chemische Reagenzien umfassen, die zur Detektion von Dickdarmkrebs erforderlich sind. Der Kit

kann weiterhin Hilfs- oder Trägerstoffe, Enzyme, Markersubstanzen, aber auch Aufbewahrungsbehältnisse, Objektträger, optische Instrumente oder andere Vorrichtungsteile umfassen, die eine biologische, chemische und oder physikalische Bestimmung von 5 Dickdarmkrebs bzw. Dickdarmkrebsvorläuferzellen ermöglichen bzw. unterstützen.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand eines Beispiels näher erläutert werden, ohne auf dieses Beispiel beschränkt zu sein.

10

Beispiel:

a) Entnahme der Stuhlprobe oder Gewebeprobe

Humaner Stuhl: Entnahme einer erbsengroßen Portion des abgesetzten Stuhls mit Entnahmehöffel, Überführung in ein 15 kommerzielles Stuhlröhrchen, schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, Lagerung bei -80 °C,

Nagerstuhl: Ausstrichen eines Stücks geformten Stuhls aus dem Enddarm, schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, Lagerung bei -80°C,

20 Humanes Tumorgewebe oder Vorläufer (aberrante Crypten, Adenome, Adenokarzinome). Biopsie im Verlauf der Koloskopie oder OP;

b) Homogenisierung der Stuhlprobe in Puffersystemen aus kommerziellen Kits oder in TE-Puffer (z.B. 10 mM Tris-HCL, pH 25 8.0, 1 mM EDTA) evtl. unter Einsatz von bis zu 400 mg/ml Proteinase K. Mixen des Homogenats bei 99 °C für 10 bis 30 Minuten, bevorzugt 15 Minuten, alternativ bei 55 C für 30 bis 60 Minuten oder bei 37 °C für 30 bis 60 Minuten; Zentrifugation bei 12000 g für 5 Minuten.

30

c) Isolierung von DNA aus Überstand des Stuhlprobenhomogenats oder aus Gewebeproben mittels kommerzieller Kits;

d) (optional:) Gegebenenfalls Anreicherung

35 a. der Zielgene aus Gesamt-DNA durch Hybridisierung seqenzspezifischer biotinylierter Oligonukleotide mit den Zielgenen APC, K-ras, β-Catenin und B-raf, Kopplung des Biotinrestes an Streptavidin und Separation über magnetische Partikel

mittels kommerzieller Kits. Die Oligonukleotidsequenzen sind so zu wählen, dass sie mit Bereichen hybridisieren, die von den nachfolgend verwendeten PCR-Primern begrenzt werden oder dicht neben dem amplifizierten Abschnitt

5 oder

b. der neoplastischen „long“-DNA durch Ausschluss von fragmentierter DNA einer Größe von < 200 bp, die charakteristisch ist für DNA aus apoptischen Zellen

10 e) PCR mit sequenzspezifischen Primern gegen ausgewählte Bereiche in den Genen für APC, K-ras, β-Catenin und B-raf:

APC: Primerpaare ermöglichen Amplifizierung teilweise überlappender Sequenzen in Exon 15 innerhalb des Bereichs gehäuft auftretender Mutationen (mutational cluster region; MCR),

β-Catenin: Primer beiderseits der in Exon 3 lokalisierten MCR,

K-ras: Primer beiderseits der in Exon 1 lokalisierten, häufig mutierten Codons 12 und 13 positioniert,

B-raf: Primer in Exon 15 lokalisiert, die Codons 593, 599 und 600 flankierend.

Alle Primer werden so gewählt, dass die PCR-Produkte eine Größe von 180 bis 350 bp haben.

f) Kontrolle der PCR-Produkte auf 2 bis 3%igem Agarosegel, bevorzugt 2,5 % Agarose; gegebenenfalls Detektion von Deletionen oder Insertionen;

g) Reinigung der PCR-Produkte mit kommerziellem Kit

30 h) Mutationsanalyse der PCR-Produkte mittels geeigneter Elektrophoresetechnik, bevorzugt SSCP: 5 bis 14%iges Acrylamidgel in 0,5 x oder 1 x TBE-Puffer, bevorzugt 8 % Acrylamid in 1 x TBE, Elektrophorese bei 4 bis 15 °C; 300 mA, 2 bis 4 Stunden oder 4 °C, 100 mA, 16 Stunden

35 Herkömmliche Färbemethoden, bevorzugt Färbung mit Silbernitrat Detektion der Konformation der Einzelstränge der Proben im Vergleich zum Wildtyp-Standard

- i) (optional:) DNA-Extraktion aus dem SSCP-Gel und Sequenzierung der aus dem SSCP-Gel extrahierten DNA oder der korrespondierenden PCR-Produkte

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur nichtinvasiven Früherkennung von Dickdarmkrebs und/oder Darmkrebsvorläuferzellen durch Mutationsanalyse der Gene für APC, K-ras,  $\beta$ -Catenin und B-raf in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass  
5 das Verfahren folgende Schritte umfasst:
- Entnahme einer Stuhl- und/oder Gewebeprobe,
  - Homogenisieren der Probe,
  - 10 - Gewinnung von DNA aus der Probe,
  - Durchführung einer Amplifizierungsreaktion in den Genen für APC, K-ras,  $\beta$ -Catenin und B-raf, wobei für APC Primer
- 15 s1 TTGCAGTTATGGTCAATACCC,  
as1 GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG,  
s2 CCTCAAAAGGCTGCCACTTG,  
as2 CTGTGACACTGCTGGAACCTCGC,  
s3 AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG,  
as3 TGGCATGGTTGTCCAGGGC,  
20 s4 ACAAACCATGCCACCAAGCAGA,  
as4 GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG,  
s5 TTCCAGATGCTGATACTTTA,  
as5 CTGAATCATCTAATAGGTCC,  
oder alternativ  
25 s2 GAATCAGCTCCATCCAAGT,  
as2 TTTCTGCTATTGCAGGGT,  
für K-ras die Primer  
s CTGGTGGAGTATTGATAGTG,  
as TCTATTGTTGGATCATATTG,  
30 und für  $\beta$ -Catenin die Primer  
s CTGATTGATGGAGTTGGAC,  
as CTTGAGTGAAGGACTGAGAA,  
und für B-raf die Primer  
s TGTATCACCATCTCCATATC  
35 as GCATTCTGATGACTTCTGGT

verwendet werden, wobei Amplifikations-Produkte entstehen und

- Durchführung einer Mutationsanalyse in den Amplifikations-Produkten.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
5 dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion von Mutationen in ausgewählten Abschnitten der Gene für APC, K-ras, β-Catenin und B-ras mittels eines DNA-Chips erfolgt, wobei der DNA-Chip Sonden für APC, K-ras, β-Catenin und B-raf aus denjenigen Bereichen der genannten  
10 Gene enthält, die durch die in Anspruch 1 genannten Primersequenzen flankiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
15 dadurch gekennzeichnet, dass APC-, K-ras-, β-Catenin-Gene und B-raf aus einer Gesamt-DNA durch Hybridisierung sequenzspezifischer biotinylierter Oligonukleotide mit den Genen APC, K-ras, β-Catenin und B-raf mittels Kopplung des Biotinrestes an Streptavidin und nachfolgender Trennung über magnetische Partikel  
20 angereichert werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
25 Amplifizierungs-, insbesondere PCR-Produkte in einem Agarose-Gel vor einer Reinigung für Kontrollzwecke aufgetrennt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
30 die Mutationsanalyse der PCR-Produkte mittels Elektrophoresetechnik erfolgt, bevorzugt SSCP, alternativ mittels eines Chromatographieverfahrens, bevorzugt eines HPLC-basierten Verfahrens.
- 35 6. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass detektierte mutagene Konformationen eines Einzelstranges isoliert und gegebenenfalls sequenziert werden.

7. Primersequenzen ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

für APC die Primer

s1 TTGCAGTTATGGTCAATAACCC,  
5 as1 GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG,  
s2 CCTCAAAAGGCTGCCACTTG,  
as2 CTGTGACACTGCTGGAACCTCGC,  
s3 AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG,  
as3 TGGCATGGTTTGTCCAGGGC,  
10 s4 ACAAACCATGCCACCAAGCAGA,  
as4 GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG,  
s5 TTCCAGATGCTGATACATTAA,  
as5 CTGAATCATCTAATAGGTCC,  
oder alternativ  
15 s2 GAATCAGCTCCATCCAAGT,  
as2 TTTCTGCTATTCAGGGT,  
für K-ras die Primer  
s CTGGTGGAGTATTCAGTAGTG,  
as TCTATTGTTGGATCATATTG,  
20 und für β-Catenin die Primer  
s CTGATTTGATGGAGTTGGAC,  
as CTTGAGTGAAGGACTGAGAA,  
und für B-raf die Primer  
a TGTATCACCATCTCCATATC,  
25 as GCATTCTGATGACTTCTGGT.

8. Verwendung der Primersequenzen nach Anspruch 7 zur Mutationsanalyse, insbesondere zur Analyse der APC, K-ras, β-Catenin- und B-raf-Gene.

30

9. Kit, umfassend die Primer ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

für APC die Primer

s1 TTGCAGTTATGGTCAATAACCC,  
35 as1 GTGCTCTCAGTATAAACAGGATAAG,  
s2 CCTCAAAAGGCTGCCACTTG,  
as2 CTGTGACACTGCTGGAACCTCGC,  
s3 AGCACCCCTAGAACCAAATCCAGCAG,

as3      TGGCATGGTTGTCCAGGGC,  
s4      ACAAACCATGCCACCAAGCAGA,  
as4      GAGCACTCAGGCTGGATGAACAAG,  
s5      TTCCAGATGCTGATACTTTA,  
5      as5      CTGAATCATCTAATAGGTCC,  
oder alternativ  
s2      GAATCAGCTCCATCCAAGT,  
as2      TTTCTGCTATTCAGGGT,  
für K-ras die Primer  
10     s      CTGGTGGAGTATTTGATAGTG,  
as      TCTATTGTTGGATCATATTG,  
und für β-Catenin die Primer  
s      CTGATTTGATGGAGTTGGAC,  
as      CTTGAGTGAAGGACTGAGAA,  
15     und für B-raf die Primer  
a      TGTATCACCATCTCCATATC,  
as      GCATTCTGATGACTTCTGGT  
und gegebenenfalls Informationen zum Kombinieren der Inhalte  
des Kits.  
20  
10. Verwendung des Kits nach Anspruch 9 zur Detektion von  
Dickdarmkrebs und/oder Dickdarmvorläuferkrebszellen.